

光食環境科学研究室（研究室紹介）

著者	和田 直也
著者別名	Wada Naoya
雑誌名	生命科学
号	2009
ページ	209-214
発行年	2010-03-31
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00000108/

光食環境科学研究室

—生物発光の基礎研究と食品科学への応用を目指して—

(第 14 研究室 和田 直久 教授)

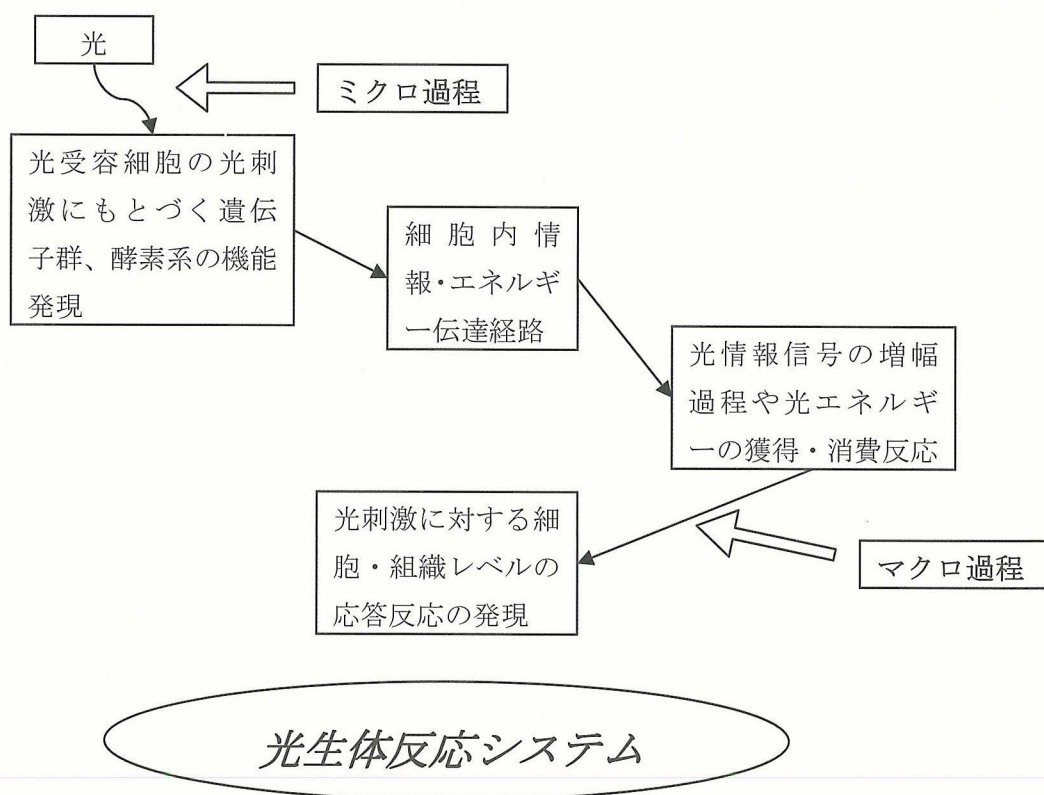
Laboratory of Photoenvioromental Systems

1. はじめに

バクテリアであれ、動植物であれ“光”との係わり合いは生物の営みにとって極めて重要である。光生物学とは地球上に生息する動植物の終局的なエネルギー源であり、かつ有効な情報伝達手段である“光”の関与する生命現象—光合成、視覚などを分子レベルから細胞、個体レベルさらには地球レベルで取り扱う総合的学際領域をいう。信号あるいは情報としての光と分子内電子とのミクロ（電子・分子）レベルにおける初期相互作用を直接刺激としてマクロ（細胞・組織体）レベルにおける光作用に対する応答発現反応に至る情報伝達経路を一つのシステムと看做し、現代科学の知識（量子化学、遺伝子・タンパク質工学、細胞生物学な

ど）を援用して多面的に研究するには格好の対象である。

当研究室では特にホタル、発光バクテリア、発光キノコなどの発光生物がどのような仕掛けで光を放つのか、或はその生理的意義は何か?—分子レベルや細胞レベルでシステム論の立場から明らかにすることや、地球環境が発光生物に与える影響等を光モニタリングの指標として活用する可能性を検討しており、現在、計算化学実験グループと生物発光スペクトル解析実験グループの2グループ制で研究活動を行っている。また、これら基礎研究の成果を、遺伝子解析、医療診断、環境問題や食品科学等への応用開発に生かすことも目標としている。これらの課題を達成するために異分野の研究



者との交流を重視し、東洋大理工学部、他大学や公的研究機関との共同・協力研究を展開する。

現在の主な研究

(1) ヤコウタケの発光に及ぼす pH の影響とその形態観察

【目的】

日本では約 10 種類ほどの発光キノコが確認されており、本研究で扱うヤコウタケ (*Mycena chlorophos*) は、傘の直径が約 2cm 程度でキシメジ科クヌギタケ属の発光キノコである。明るい場所で観察すると傘、柄、共に白色で、暗い場所で観察すると傘は淡緑色の発光であるが、柄では発光が見られない。ヤコウタケは発光性のキノコの中でも特に発光が強く、日本では最も明るいキノコとされているが、その発光機構は未だに解明されていない。

本研究では、ヤコウタケの形態観察と pH 変化に伴う発光パターンの変化の特徴を調べることを目的とした。

【方法】

研究室に組み立てられた培養室 (60×120×90cm のコンテナにビニールを覆い、温度 20～25℃、湿度 90%以上に保った構造) で培養したヤコウタケの子実体をサンプルとして実験を行った。

pH 変化による発光パターンの測定では、pH

の異なる酢酸緩衝液 (0.01M 酢酸緩衝液 pH4、および pH6) を作成し用いた。そして、それらをヤコウタケの切片 (傘とヒダ) とヒダのみを採取したサンプルに滴下し、ルミカウンター 1000 (マイクロテック・ニチオン社) [電圧: 600V、サンプル 0.15g に対して緩衝液滴下量: 30μl] を用いて発光強度の時間変化を測定した。

また、発光しているヤコウタケから発光部位であるヒダのみを採取し、蛍光顕微鏡

(OLYMPUS 社) でその形態組織を観察した後、酢酸緩衝液を滴下しヤコウタケの発光に対する効果を観察した。

【結果・考察】

ヤコウタケサンプルに pH4 の酢酸緩衝液を滴下すると発光が大きく阻害されたが、pH6 を滴下後、発光の回復が見られた (図 1)。しかし、室温 (22℃) に 24 時間放置させ発光量を極端に低下させたサンプルに pH4 を滴下するとヤコウタケは、完全に消光し pH6 を滴下しても発光は回復しなかった (図 2)。これらの結果から、ヤコウタケの発光は滴下した酢酸緩衝液の pH に依存しておりまた、発光が完全に消光してしまうと発光は回復しないと考えられる。

今後は、ヤコウタケの発光量閾値 (消光させたサンプルに pH6 を滴下しても発光量がある値以上に強くなければ、再発光は起こらない発光量の限界値) の存在の有無を検証して報告の予定である。

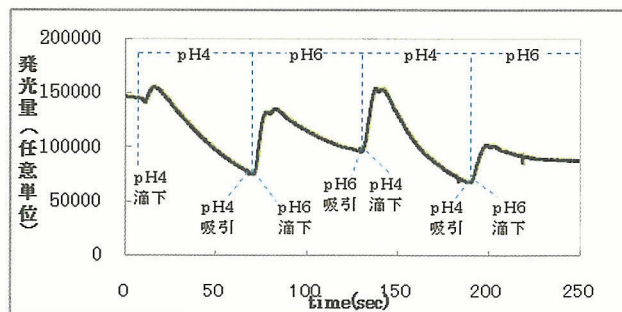


図 1. 酢酸緩衝液 pH4、および pH6 を交互にヤコウタケサンプルに滴下した時の発光量の時間変化

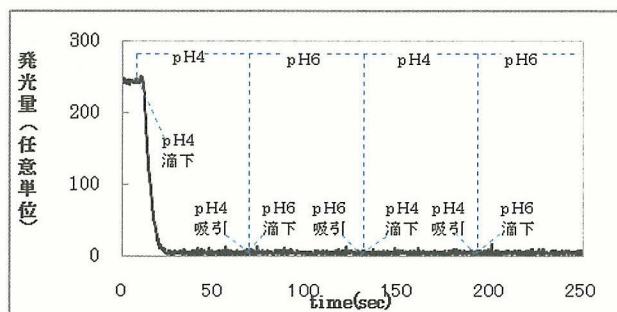


図 2. 発光量が極端に低いヤコウタケサンプルに酢酸緩衝液 pH4、および pH6 を交互に滴下した時の発光量の時間変化

(2) ホタルの発光に関与する酵素ルシフェラーゼの分子力学法による構造予測計算の試み

【目的】

ホタルの生物反応発光を触媒する酵素はルシフェラーゼである。これまで、反応中間体を含めたルシフェラーゼ反応の X 線構造データはゲンジボタルに対してのみ測定され、全部で 4 種類が報告されている。その内、2 種類について本研究で取り上げた。すなわち、ATP を活性中心に保持し、アミノ酸残基 202~205 の部分(ループ)と ATP ピロリン酸(PPi)部分の X 線構造データが欠損しているルシフェラーゼ(E1) (PDB コード:2d1q)と、そのループが確定している X 線構造データであり反応生成物オキシルシフェリン(Oxyln)と AMP の 2 つの基質が活性中心に配位しているルシフェラーゼ(E2) (PDB:2d1r)である。

本研究の目的は、分子力学計算ソフト「Discovery Studio (以下:DS2.5)」を使い E1 のループの構造を修復し、E2 のループとの比較、PPi のゆらぎの計算予測を試みる。

【方法】

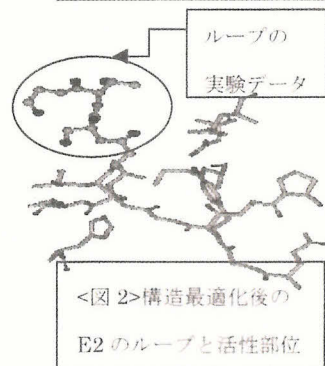
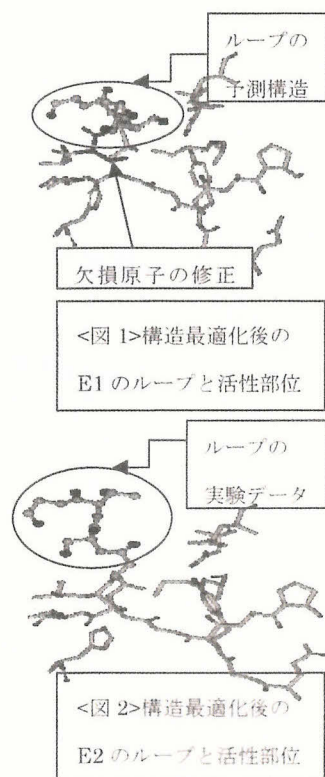
DS2.5 に E1 と E2 の X 線構造解析データを読み込ませ、H 原子を付加後その欠損アミノ酸残基や欠損原子を DS2.5 の機能(Loop Refinement、Flexible Docking)を用いて修正した。その結果、E1、E2 両者ともタンパク質自体のそう電荷は 0 であった。そして分子力学法(MM)を用いて構造最適化を行い、E1 のループの部分であるアミノ酸残基 202~205 に“Loop Refinement”を実行してループの候補を作成した。その中でスコア値の良いものをループとして選択し E2 の対応する構造と比較した。次に、E1 の活性中心にルシフェリン(Ln)を挿入して、AMP を ATP に補正した。ATP の電荷(e)は-2,-3,-4 の 3 通りを考え、E1 の総電荷が-2,-3,-4 のいずれかであると仮定した。一方 E2 では、AMP は e=-2、Oxyln では e=-1 であるため E2 の総電荷は e=-3 であると考えた。こ

れらに対し MM を行った。その後 E1 に“Flexible Docking”を行い、Ln の活性部位における配位を予測した。そして再度、MM を行った。最後に、E1 に制限条件(ATP、Ln、活性部位とタンパク質全体に付加した水素以外を固定)を課し MM を行った。そして、全ての計算結果と構造を比較として考慮し、分子動力学計算(以下:MD)を用いて ATP の PPi 部分のゆらぎを予測した。

【結果】

MM 計算を繰り返し行っていくと E1 のエネルギーが下がっていき、制限条件を課すとさらにエネルギーが下がっていった。つまり MM 計算を繰り返すことで、より安定な構造に近づいていくことが分かった。図 1 は“Loop Refinement”を行い一番スコア値の良い候補であった E1 のループで、図 2 は E2 のループである。両者を比較すると E1 ループの候補の中でスコア値が一番良い候補が E2 のループと一番近い構造を示すことが分かった。さらに、E1 に対して分子動力学計算(MD)を用いて

0.1fs のスケールで ATP のゆらぎをシミュレートした結果、その PPi が見えないのは、時間の経過とともにその振幅が大きくなり回折像として検出されなかったためと考えられる。この結果は X 線解析データの温度因子の値と良い相関がある。



2. 研究室雑感-卒業生からの近況便り

生命科学部卒業生（第7期生） 橋本 一範 （帝国インキ製造株式会社勤務）

皆様はじめまして。和田研究室、06年度卒業生の橋本と申します。

卒業後の近況の前に、まずは和田研究室に在籍していた頃やっていた事、大学時代の事について、簡単に説明をさせていただきます。

皆さんは、ホタルという生物をご存知でしょうか。綺麗な水辺で夜になると淡い光を放ちながら飛ぶ昆虫です。どのようにしてホタルは光るのか、考えた事がありますでしょうか。私は、その光る(発光)メカニズムを解明する為の実験を行っていました。

ホタルが発光する反応は、次のようになります。

①発光基質であるルシフェリンが ATP と Mg^{2+} の存在下で、酵素添加酵素ルシフェラーゼ(E)により 4 員環構造を持つ不安定なジオキセタノンになります。

②その後、オキシルシフェリンの励起状態が生成され、基底状態に遷移します。この際に、発光すると考えられています。

しかし、これまでに短寿命反応中間体を分光学的に検出したという報告はありません。私の取り組んでいた研究の目的は、ホタルの発光における化学エネルギー→光エネルギー変換機構の特徴を明らかにする為に Caged-ATP という物質を用いてミリ秒時間域における反応素過程の解明に向けた基礎実験を行なう事でした。ちなみに、Caged-ATP のような Caged 化合物とは、機能性分子(生理活性物質・蛍光物質等)の機能発現部位を遮蔽(caging)し本来の機能を有しない化合物群の事です。本来の機能を発揮させるには、光の照射により遮蔽していた部位を脱離させる事が必要になります。私の実験では、この光について、レーザー光を使用しました。実験結果については、あまり良いデー

タは採れず、次に活かせば良いなという感じでした。

実験の他に、大学4年間を通じて私はバドミントンを行っていました。大学ではサークルに所属していました。サークルの飲み会などにはあまり顔を出さず、とにかくバドミントンだけをやっていました。サークル以外にも地元のクラブでも行っており、サークルでもクラブでも多くの大会に出て、本当に今考えるとバドミントン漬けの生活でした。そのお陰か、身体的にも精神的にも多少はタフになったと思います。この事は、今日まで仕事を行って来て、かなり役に立っていると感じます。

さて、では次に卒業後の進路についてです。卒業後は民間企業への就職という進路を選択しました。帝国インキ製造株式会社（以下、弊社と記述させていただきます）にて働いております。

弊社は色彩情報業を扱っています。弊社の主な商品としては、スクリーン印刷用インキになります。印刷したい箇所をメッシュ状にした印刷版上にインキを置いて刷る、という手法の印刷です。これは、水と空気以外であれば何にでも印刷する事が可能です。しかし、弊社は単にインキを売るだけではありません。色彩情報業を扱う会社として、インキを通してお客様の求めている価値を提供し、社会への貢献を目指しています。

弊社のインキは下記のような製品で利用されています。

- ・携帯電話(本体、ボタン、等)。
- ・自動車のスピードメーター。
- ・家電の操作盤。
- ・自動販売機のダミー缶。
- ・CD、DVD、BD。

私の職務は、インキの品質管理を行なっています。主業務は、日々製造しているインキの検査・合否判断を行ないます。また、製造するインキの品質が安定するように造り込みの管理を行ないます。造り込み管理=製造方法の改善

では、計画を立て結果を予測し、実施した結果から考察を行なって次の改善に繋げるという流れで進めます。これはPDCAと呼ばれます。Plan(計画)⇒Do(実行)⇒Check(評価)⇒Action(改善)の順で進める事です。これは大学の研究と同じ流れです。仮説を立てて実験し、その結果から考察を行ない次の実験に進む。大学時代で学んだ事を活かしています。

最後になりましたが、東洋大学と和田研究室の益々のご発展をお祈りし、筆をおかせて頂きます。ありがとうございます。

3. 卒業後の進路状況等

卒業生は大学院（東洋大学大学院を含む）に進学したり、IT情報関連（バイオインフォマテックスを含む）等の企業に就職したり活躍している。そして、東北大学流体科学研究所のポスドクとして就職したものもいる。また、外部研究機関で卒論指導を受ける機会を積極的に設けているが、現在までに地方大学の医学部の編入試験に合格し将来臨床医を目指す人、医系大学大学院医学研究科へ進学する人や、理学療法士などの医療分野の仕事につく人も出てきており、卒業研究を通して各自の進路希望が叶えられるように、また社会へ出ても通用する人材の育成に努めている。

研究業績

原著論文等

- 1) K. Odai, S. Nisiyama, Y. Yoshida and N. Wada : ^1H -nmr spectrum and computational study of firefly luciferin in DMSO, J. Molecular Structure: THEOCHEM Vol.901, 2009, 60-65.
- 2) H. Sakai and N. Wada : Characteristics of the IR spectra of firefly luciferin and related biomolecules calculated by density functional theory : INFORMATION, vol.13, 2010, 1833 - 1844

国内学会などでの発表・講演

- 1) 田中 正俊、和田 直久、他 5 名 : 高分子ゲルの構造変化と GFP のケイ光特性の相関、2009 年 5 月、ナノ学会第 7 回大会（於：東大）
- 2) 景山 健志、和田 直久、他 4 名 : Caged ATP を用いたホタル発光反応の時間分解測定によるルシフェリン・ルシフェラーゼ相互作用の研究、2009 年 5 月、ナノ学会第 7 回大会（於：東大）
- 3) 柴田 陸雄、西山 聡子、吉田 泰彦、和田 直久 : ホタルルシフェリンの ^1H -nmr および吸収スペクトルの理論解析—化学発光反応の解明に向けて—、2009 年 6 月、第 26 回生物発光化学発光研究会
- 4) S. Hayashi, R. Fukushima and N. Wada : ヤコウタケの発光分子機構の解明、2009 年 10 月、第 47 回生物物理学会
- 5) 酒井 博則、和田 直久 : 第一原理計算によるホタル生物発光反応に関与する関連化合物の赤外スペクトルの解析、2010 年 7 月、第 2 回理工学部生体医工学科研究者交流会
- 6) 高松 大輝、林 秀平、和田 直久 : The study of M. Chlorophos bioluminescence – Establishment of method to purify lumiferous material – 2010 年 7 月、第 2 回理工学部生体医工学科研究者交流会
- 7) T. Kageyama, N. Wada, 他 2 名 : ケージド ATP の光分解で誘発されるホタル生物発光の時間依存性、2010 年 9 月、第 48 回生物物理学会
- 8) S. Hayashi, D. Takamatsu, J. Tamaoka and N. Wada : ヤコウタケの発光に関わる生体物質の構造解析、2010 年 9 月、第 48 回生物物理学会
- 9) 酒井 博則、和田 直久 : Calculation of IR spectra of firefly luciferin and its related biomolecules calculated by density functional theory, 2010 年 10 月、第 27 回生物発光化学発光研究会
- 10) 柴田 陸雄、畠中 高輝、和田 直久 : t-BuONa を添加した DMSO 溶媒中でのホタルルシフェリンの化学発光、2011 年 3 月、第 91 回化学会年会

国際学会などでの発表・講演

- 1)H. Sakai and N.Wada : Characteristics of the IR spectra of firefly luciferin and related biomolecules calculated by density functional theory, 4/2010, 16th International Symposium on Biolumi. and Chemiumi. (Lyon)
- 2)T. Kageyama, M. Tanaka, T. Sekiya, S. Ohno and N.Wada : Time course of firefly bioluminescence triggered by photolysis of caged-ATP,4/2010,16th International Symposium on Biolumi. and Chemilumi. (Lyon)
- 3)N.Wada and S. Hayashi and R. Fukushima : Study of the molecular mechanism in *Mycena Chlorophos* bioluminescence, 12/2010, PACIFICHEM2010 (Honolulu)